



Veröffentlichungsnummer: **0 428 947 A1**

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

Anmeldenummer: **90121478.3**

Int. Cl.⁵: **C12P 19/26**

Anmeldetag: **09.11.90**

Priorität: **15.11.89 DE 3937891**

Veröffentlichungstag der Anmeldung:
29.05.91 Patentblatt 91/22

Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

Anmelder: **Forschungszentrum Jülich GmbH**
Postfach 1913, Wilhelm-Johnen-Strasse
W-5170 Jülich(DE)

Anmelder: **CIBA-GEIGY AG**

CH-4002 Basel(CH)

Erfinder: **Kragl, Udo**
Artilleriestrasse 56
W-5170 Jülich(DE)

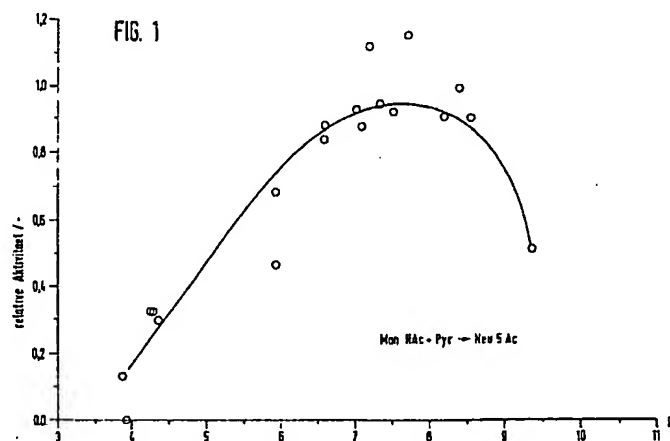
Erfinder: **Wandrey, Christian, Prof.**
Wolfshovener Strasse 139
W-5170 Jülich(DE)

Erfinder: **Ghisalba, Oreste**
Eschenweg 3
CH-4153 Reinach BL(CH)

Erfinder: **Gygax, Daniel**
Wulligweg 357
CH-4204 Himmelried(CH)

Enzymatisches Verfahren zur Herstellung von N-Acetylneuraminsäure.

N-Acetylneuraminsäure wird ausgehend von N-Acetylglucosamin in einem Reaktor erhalten, der sowohl N-Acetylglucosamin-2-Epimerase (E.C. 5.1.3.8) für die Isomerisierung des GlcNAc in ManNAc enthält, als auch die für die Umsetzung des gebildeten ManNAc mit Brenztraubensäure zu Neu5Ac befähigte N-Acetylneuraminsäure-Pyruvat-Lyase (E.C. 4.1.3.3) und in den GlcNAc und Pyr eingespeist und aus dessen Ablauf Neu5Ac gewonnen wird. Vorzugsweise wird kontinuierlich und insbesondere im Enzymmembranreaktor bei pH 7,5 und 25°C gearbeitet, speziell mit Verweilzeiten von 0,2 bis 10 h, sowie mit überschüssigem GlcNAc gegenüber Pyr, das gegebenenfalls nachdosiert wird. Epimerase und Lyase liegen vorzugsweise im Reaktor in einem Aktivitätsverhältnis vor, das dem Kehrwert des Quotienten aus den Umsetzungsgeschwindigkeiten entspricht.



EP 0 428 947 A1

EP 0 428 947 A1

antibakteriell wirksamen Mitteln möglich.

Ausgangsmaterial für diese N-Acetylneuraminsäurebildung ist das relativ teure N-Acetylmannosamin, auf dessen Zugänglichkeit aus N-Acetylglucosamin (GlcNAc) bereits im oben zitierten Aufsatz von M.-J. Kim hingewiesen wird, der als Möglichkeiten zur ManNAc-Gewinnung eine basenkatalysierte Isomerisierung von GlcNAc unter Bildung von ManNAc auf chemischem Wege oder die Einbeziehung einer epimerasekatalysierten Isomerisierung von GlcNAc zu ManNAc in den Herstellungsprozeß von Neu5Ac in Erwägung zieht, ohne daß jedoch irgendwelche konkreten Angaben gemacht werden, obwohl die Epimerase und deren Brauchbarkeit zur Umwandlung von GlcNAc in ManNAc seit langem bekannt waren (siehe Ghosh et al. J. of Biol. Chem. 240 (1965) 1531-6).

Der vorliegenden Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zu schaffen, bei dem zum einen von dem billigeren GlcNAc ausgegangen wird und zum anderen irgendwelche Zwischentrennungen vermieden werden können und vorzugsweise Aktivitätsminderungen vermieden werden.

Das zu diesem Zweck entwickelte erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man die N-Acetylneuraminsäurebildung in einem Reaktor herbeiführt, der sowohl die Epimerase als auch die Lyase enthält und in den N-Acetylglucosamin und Pyruvat eingespeist werden und aus dessen Ablauf die N-Acetylneuraminsäure gewonnen wird.

Das Verfahren nutzt in eleganter Weise die Tatsache aus, daß GlcNAc nicht von der Lyase umgesetzt wird und daß letztere relativ billig ist und daher unter Bedingungen eingesetzt werden kann, die für die Aktivität der Lyase nicht optimal sind. Es basiert auf der Erkenntnis, daß die Stabilitäts- und pH-Optima beider Enzyme ähnlich sind. Durch eine Optimierung der Reaktionsbedingungen können die Aktivitäten beider Enzyme, der Epimerase und der Lyase, aufeinander abgestimmt werden und z.B. die inhibierende Wirkung des Pyruvats auf die Epimerase durch mindere Pyruvatkonzentrationen zurückgedrängt werden. Das im Reaktionssystem vorhandene Pyruvat bildet selbst bei relativ geringen Konzentrationen einen erheblichen Überschuß gegenüber dem entstehenden ManNAc, so daß die Umsetzung zur Neu5Ac glatt verläuft unter Verbrauch von ManNAc, dessen Bildung aus GlcNAc dadurch begünstigt wird.

Geeignete Konzentrationen im Reaktor liegen bei 50 - 500 mMol GlcNAc/l insbesondere bei etwa 200 mMol GlcNAc/l und 30 - 200 mMol Pyruvat/l insbesondere 50 - 150 mMol Pyruvat/l, speziell um etwa 80 mMol Pyruvat/l.

Vorzugsweise wird kontinuierlich und insbesondere in einem Enzymmembranreaktor gearbeitet.

Im Enzymmembranreaktor (EMR) werden die in löslicher Form darin vorliegenden Enzyme durch die vor dem Reaktorausgang befindliche Ultrafiltrationsmembran mit entsprechendem cut-off zurückgehalten. Eine Trägerfixierung mit entsprechenden Aktivitätsminderungen erübrigt sich daher. Der Reaktor kann vor Betriebsbeginn sterilisiert werden, so daß auf die Zugabe antibakteriell wirksamer Mittel verzichtet werden kann.

Da der EMR unter Auslaufbedingungen arbeitet, kann ebenfalls auf Puffersubstanzen verzichtet werden, wenn der Einlauf-pH entsprechend eingestellt wird. Der Verzicht auf diese Stoffe erleichtert die spätere Produktisolierung, die analog zu beschriebenen Verfahren erfolgt (vgl. R. Schauer a.a.o.)

Die beigefügten Zeichnungen dienen dem besseren Verständnis der Erfindung. Es zeigen im einzelnen:

Figur 1, 2 und 4 Kurven für die relative Aktivität der Enzyme in Abhängigkeit vom pH-Wert;
Figur 2A die relative Aktivität der Epimerase in Abhängigkeit von der Pyruvat-Konzentration;
Figur 3 die Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten der Neu5Ac-Bldg. von der Temperatur;
Figur 5 den Gleichgewichtsumsatz in Abhängigkeit vom Pyr/ManNAc-Verhältnis für unterschiedliche ManNAc-Konzentrationsbereiche;

und

Figur 6 das Elutionsverhalten von ManNAc, Neu5Ac und Pyr-H auf einer Anionenaustauschersäule.

Der Einsatz sowohl der Epimerase als auch der Lyase in demselben Reaktionssystem macht die Auswahl geeigneter Reaktionsbedingungen notwendig, die der enzymatischen Aktivität beider Enzyme angepaßt ist:

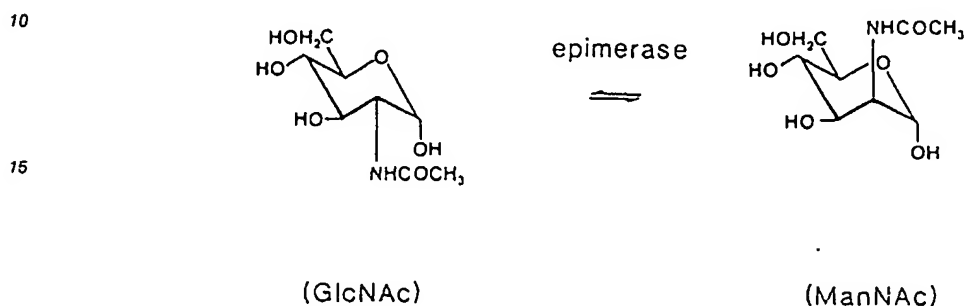
Es wurde daher zunächst die pH-Abhängigkeit der enzymatischen Reaktionen sowohl für die Neu5Ac-Bildung mittels Lyase als auch der ManNAc-Bildung mittels Epimerase untersucht: Die angefügten Figuren 1 und 2 zeigen die für 25 °C gefundenen Kurven, aus denen hervorgeht, daß ein um den Neutralbereich (pH 7) herum gewählter pH-Wert für beide Reaktionen günstig ist.

Die Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten der Neu5Ac-Bildung bei pH 7,5 (s. Figur 3) ergab, daß für die Neu5Ac-Bildung grundsätzlich möglichst niedrige Temperaturen nützlich sein sollten: Da jedoch bei niedriger Temperatur (von z.B. 10 °C) eine deutliche Verminderung der Enzymaktivität auftritt und die für die Umsetzung als vorgelagerte Reaktionen geschwindigkeitsbestimmenden Mutarotationseffekte der Zucker (α -Anomer \rightleftharpoons β -Anomer) bei niedrigen Temperaturen weniger rasch ablaufen, erscheinen Arbeiten um 25 °C zweckmäßig.

EP 0 428 947 A1

Wie Figur 2A zeigt, wird die Isomerisierung von GlcNAc zu ManNAc durch Brenztraubensäure mit steigender Konzentration derselben zunehmend gehemmt. Weiter Versuche zeigen, daß auch die als Produkt gewünschte N-Acetylneuraminsäure inhibierend auf die Epimerase wirkt.

In den EMR werden für die im gleichen Reaktionssystem ablaufende zweistufige Synthese GINAc und Pyruvat eingespeist. Bei Anwesenheit der Epimerase und Lyase im Reaktor findet dann zunächst eine Umwandlung von GlcNAc in ManNAc mittels der Acylglucosamin-2-Epimerase (E.C. 5.1.3.8; Datta, Methods in Enzymology 41 (1975) 407-411), nach folgender Gleichung statt:



Das sich bildende ManNAc steht sich dann einem großen Überschuß an Pyruvat gegenüber, wodurch die anschließende Umsetzung zur Neu5Ac gefördert wird.

Deren Rückreaktion wird ferner durch die im Vergleich zur gebildeten Neu5Ac in erheblichem Überschuß vorhandene Pyruvatmenge stark gehemmt, wie aus Figur 4 zu entnehmen ist.

Figur 5 zeigt schließlich, daß durch die naturgemäß im erfindungsgemäßen Reaktionssystem im starken Überschuß vorhandene Pyruvatmenge die Verlagerung der Gleichgewichtskonstanten der Neu5Ac-Bildung zu höheren Werten begünstigt wird.

Da die Isomerisierung und Neu5Ac-Bildung im gleichen System mit Hilfe der gleichzeitig anwesenden Enzyme nebeneinander ablaufen sollen, ist es wichtig, daß die Aktivitäten der Enzyme aufeinander abgestimmt sind, wobei davon auszugehen ist, daß im Gleichgewicht etwa gleiche Umsätze erreicht werden sollten.

Danach erscheint ein Aktivitätsverhältnis beider Enzyme im Reaktor zueinander nützlich, dessen Wert dem Kehrwert des Quotienten aus den jeweiligen enzymatischen Umsetzungsgeschwindigkeiten entspricht.

Bei der Einspeisung der Ausgangsstoffe GlcNAc und Pyruvat ist zu berücksichtigen, daß der GlcNAc-Menge eine beherrschende Funktion zukommt, so daß dieses in zumindest vergleichbaren molaren Konzentrationen im Reaktor vorliegen sollte, vorzugsweise jedoch im Überschuß gegenüber Pyruvat angewandt wird. Große Pyruvatüberschüsse sollten vermieden werden, da die Epimerase durch Pyruvat inhibiert wird.

Die gebildete Neu5Ac unterliegt entsprechend der Gleichgewichtslage durch Rückreaktion einer mehr oder minder starken erneuten Aufspaltung. Diese Reaktion wird zwar durch Pyruvatüberschuß gehemmt (siehe Figur 4), jedoch erscheint es zweckmäßig, kontinuierlich Reaktionsmedium aus dem EMR über eine Ionenaustauschersäule zu schicken und den Rest in den Reaktor zurückzuführen. Zwei im Wechsel betriebene Säulen sind zweckmäßig.

Wie Figur 6 zeigt, wird auf einer Anionenaustauschersäule (Dowex 1 x 2, Formiat, 25°C) Neu5Ac stärker als ManNAc festgehalten und kann somit auf der Säule angereichert werden. Ebenfalls gebundenes Pyr muß entsprechend ersetzt werden.

Für die optimierte Gesamtumsetzung erscheinen nach bisher vorliegenden Erfahrungen Verweilzeiten von 0,2 - 10 std., insbesondere von ca. 4 std., nützlich.

In Anbetracht des gefundenen breiten pH-Bereichs für abgestimmte Reaktionen, wie aus Figur 1 und 2 hervorgeht, kann ohne nennenswerten Aktivitätsverlust zwischen pH 6 und 8 gearbeitet werden. Dieser breite Bereich erleichtert das Arbeiten im kontinuierlichen Betrieb ohne Verwendung von Puffersubstanzen, da kleine pH-Schwankungen sich kaum auf den erzielten Umsatz auswirken. Der Verzicht auf Puffersubstanzen ist deshalb erstrebenswert, weil dadurch die Aufarbeitung erleichtert wird.

Puffersubstanzen sind normalerweise ionische Verbindungen, die auf dem zur Produktisolierung verwendeten Anionenaustauscher ebenfalls gebunden werden und durch geeignete chromatographische Bedingungen getrennt werden müßten. Ein typisches Chromatogramm ist in Figur 6 dargestellt. Es wurde ein Anionenaustauscher Dowex 1X2, Formiat-Form, verwendet. Als Elutionsmittel diente Ameisensäure, 1 mol/l.

EP 0 428 947 A1

Ein scale up um den Faktor 8 wurde für die Säule durchgeführt, wobei die Trennleistung erhalten blieb.

Beispiel für die enzymkatalysierte Produktion von N-Acetylneuraminsäure im Enzym-Membran-Reaktor

5

Zulaufkonzentrationen der Substrate	
N-Acetylglucosamin	200 • 10 ⁻³ mol/l
Na-Pyruvat	100 • 10 ⁻³ mol/l
ATP	5 • 10 ⁻³ mol/l
MgCl ₂ • 6 H ₂ O	5 • 10 ⁻³ mol/l

10

15

Die Substrate werden in Wasser gelöst. Mit verdünnter Natronlauge wird ein pH von 7,2 eingestellt.

20

Enzymkonzentrationen im Reaktor	
Epimerase	11,9 mg/ml
Aldolase	3,4 mg/ml

25

Betriebsbedingungen	
Temperatur	25 ° C
pH 7,2 bis 7,5 am Reaktorauslauf	
Reaktorvolumen	12 ml
Verweilzeit	2,85 g

30

35

Ergebnis

Am Reaktorauslauf werden folgende Konzentrationen gemessen:

40

- N-Acetylneuraminsäure	35 mmol/l
- N-Acetylmannosamin	20 mmol/l

45

Bezüglich des eingesetzten Na-Pyr wird ein Umsatz von 35 % erreicht. Die Raum-Zeit-Ausbeute für N-Acetylneuraminsäure beträgt 109 g/(l • d).

Ansprüche

50

1. Verfahren zur Herstellung von N-Acetylneuraminsäure durch (a) Isomerisierung von N-Acetylglucosamin in Gegenwart von N-Acetylglucosamin-2-Epimerase (E.C. 5.1.3.8) zu N-Acetylmannosamin, das dann (b) in Gegenwart von N-Acetylneuraminsäure-Pyruvat-Lyase (E.C. 4.1.3.3) mit Brenztraubensäure zu N-Acetylneuraminsäure umgesetzt wird,

55

dadurch gekennzeichnet,

daß man die N-Acetylneuraminsäurebildung in einem Reaktor herbeiführt, der sowohl die Epimerase als auch die Lyase enthält und in den N-Acetylglucosamin und Pyruvat eingespeist werden und aus dessen

EP 0 428 947 A1

Ablauf die N-Acetylneuraminsäure gewonnen wird.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Umsetzung kontinuierlich durchführt.
- 5 3. Verfahren nach Anspruch 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Umsetzung in einem Enzymmembranreaktor mit einer Ultrafiltrationsmembran mit einem cut-off vom ≥ 1000 u durchführt.
- 10 4. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Epimerase und die Lyase im Reaktor in einem Aktivitätsverhältnis vorliegen, das dem Kehrwert des Quotienten aus den jeweiligen enzymatischen Umsetzungsgeschwindigkeiten entspricht.
5. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
- 15 6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
daß im Reaktor für einen Überschuß an N-Acetylglucosamin gegenüber Pyruvat gesorgt wird, das gegebenenfalls nachdosiert wird.
6. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man den Reaktorablauf durch eine Ionenaustauschersäule zur Abtrennung der N-Acetylneuraminsäure
- 20 schickt und den Rest in den Reaktor zurückführt.
7. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die enzymatischen Reaktionen bei pH 7,5 und 25°C ablaufen läßt.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
- 25 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 7,
daß mit mittleren Verweilzeiten von 0,2 - 10 h, insbesondere von 4 h gearbeitet wird.

30

35

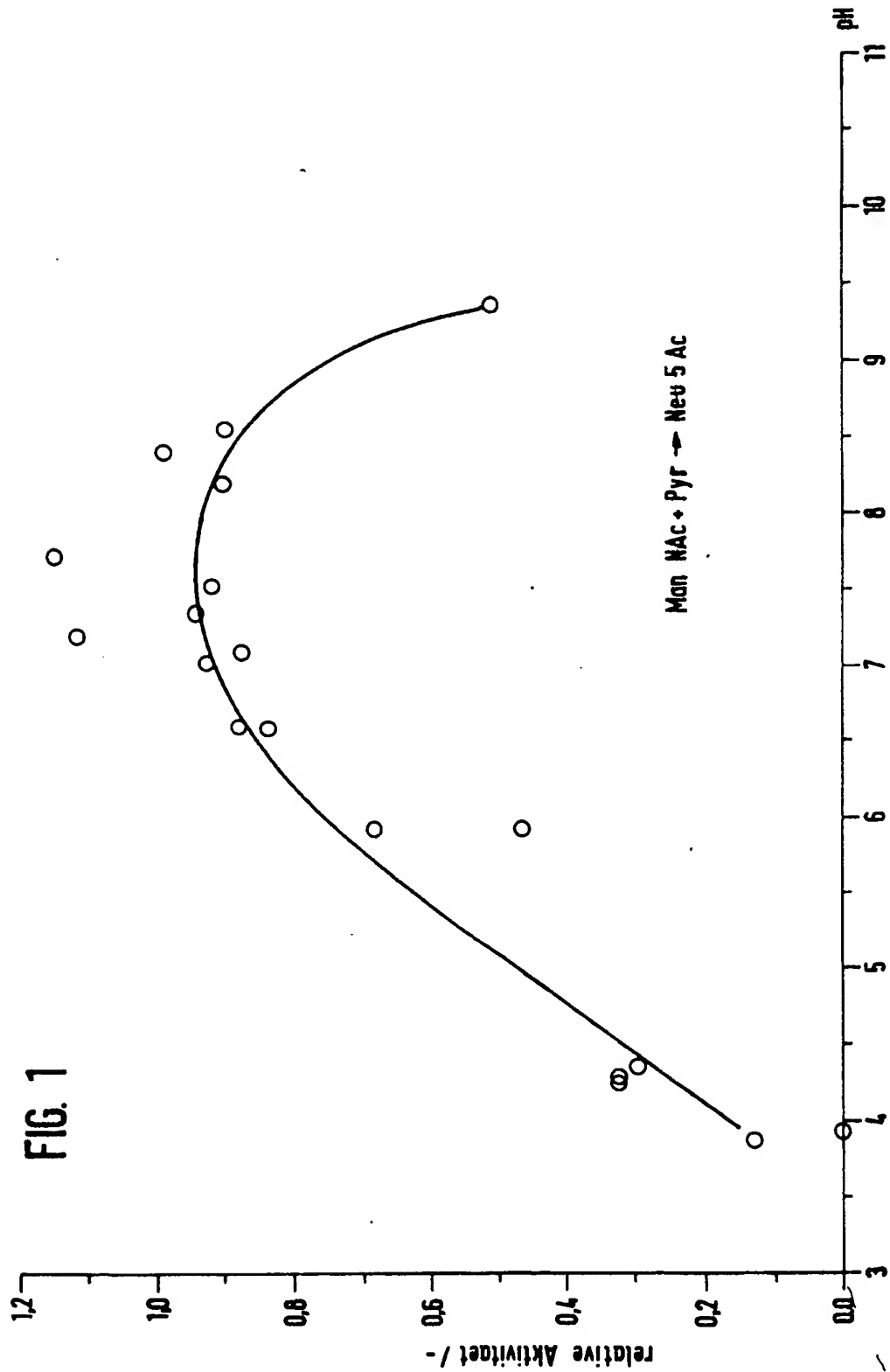
40

45

50

55

EP 0 428 947 A1



EP 0 428 947 A1

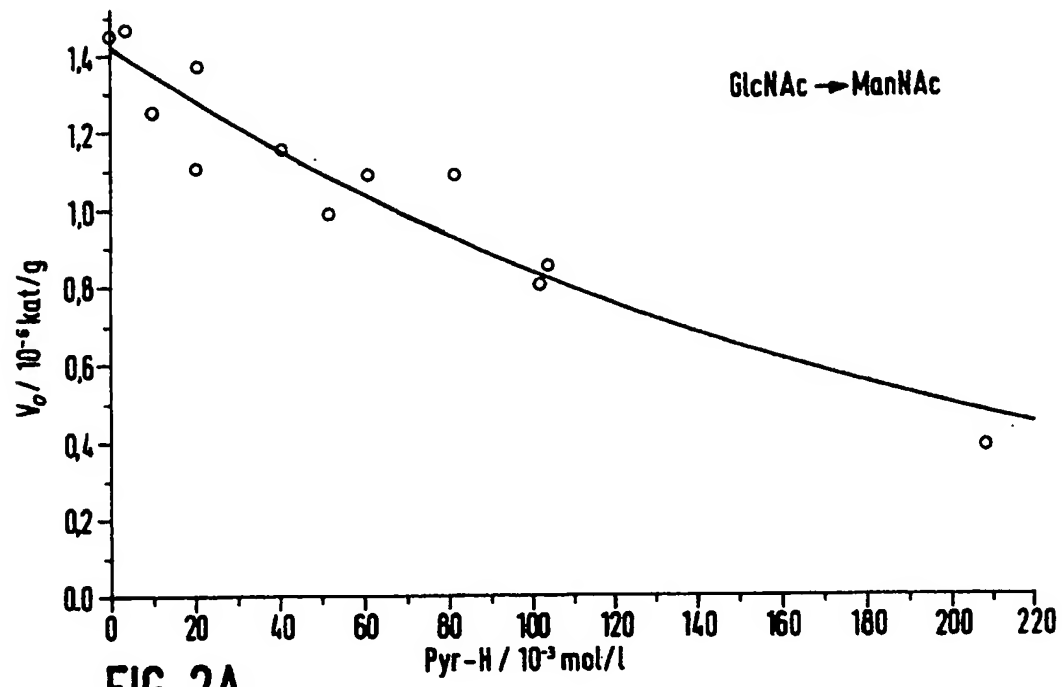


FIG. 2A

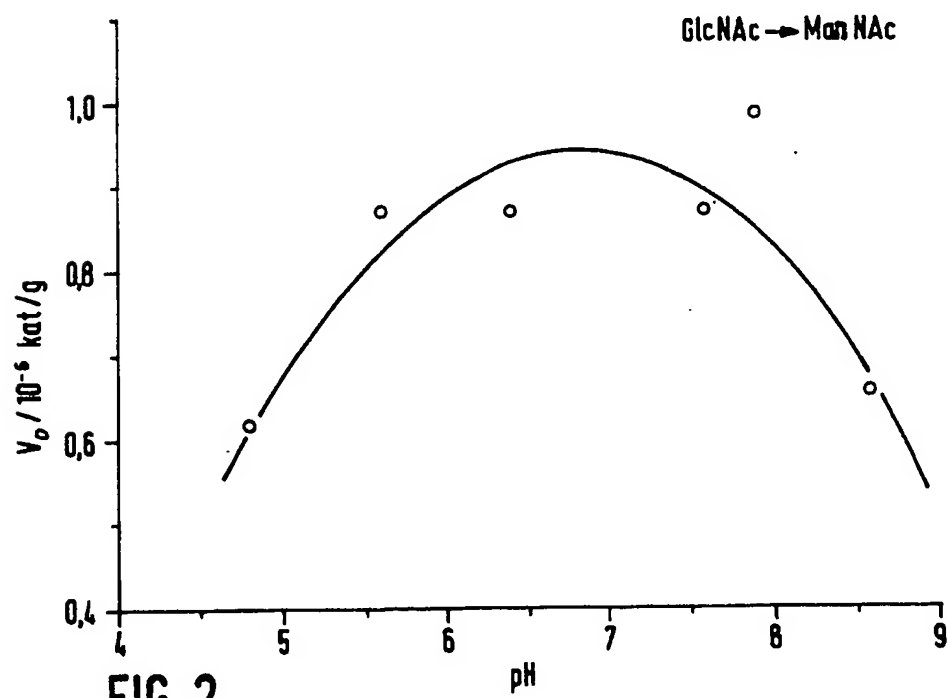
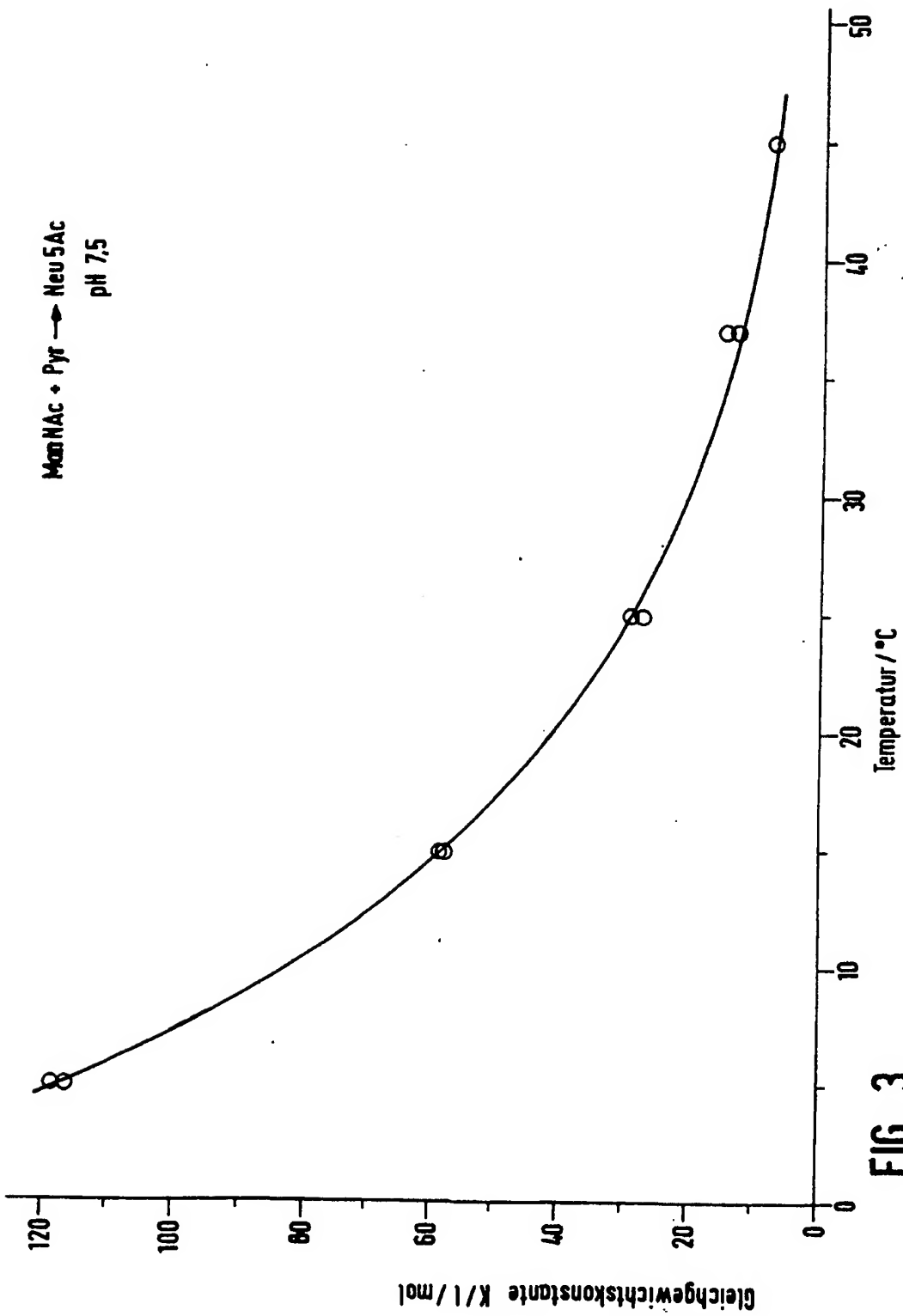


FIG. 2

EP 0 428 947 A1



EP 0 428 947 A1

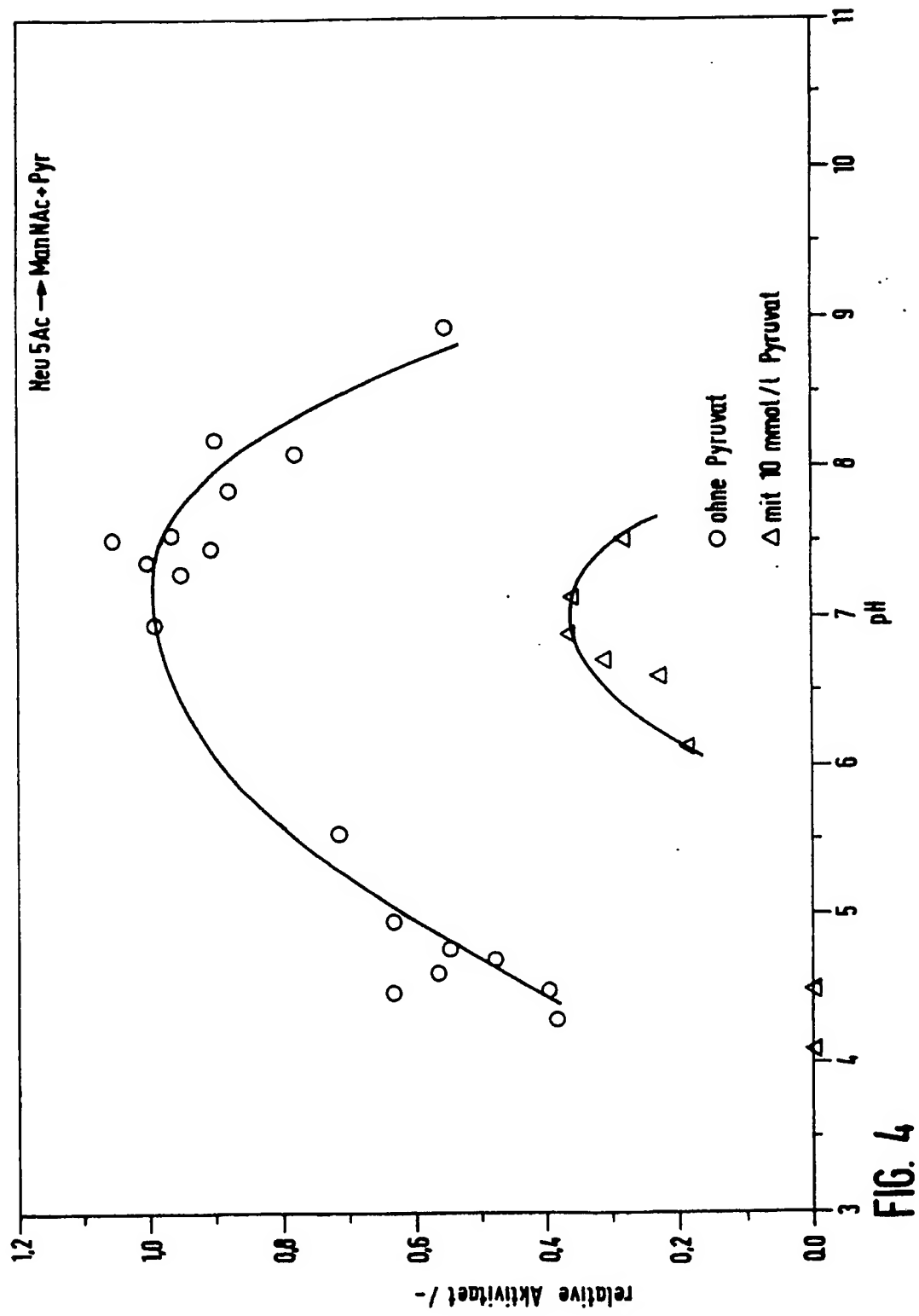


FIG. 4

EP 0 428 947 A1

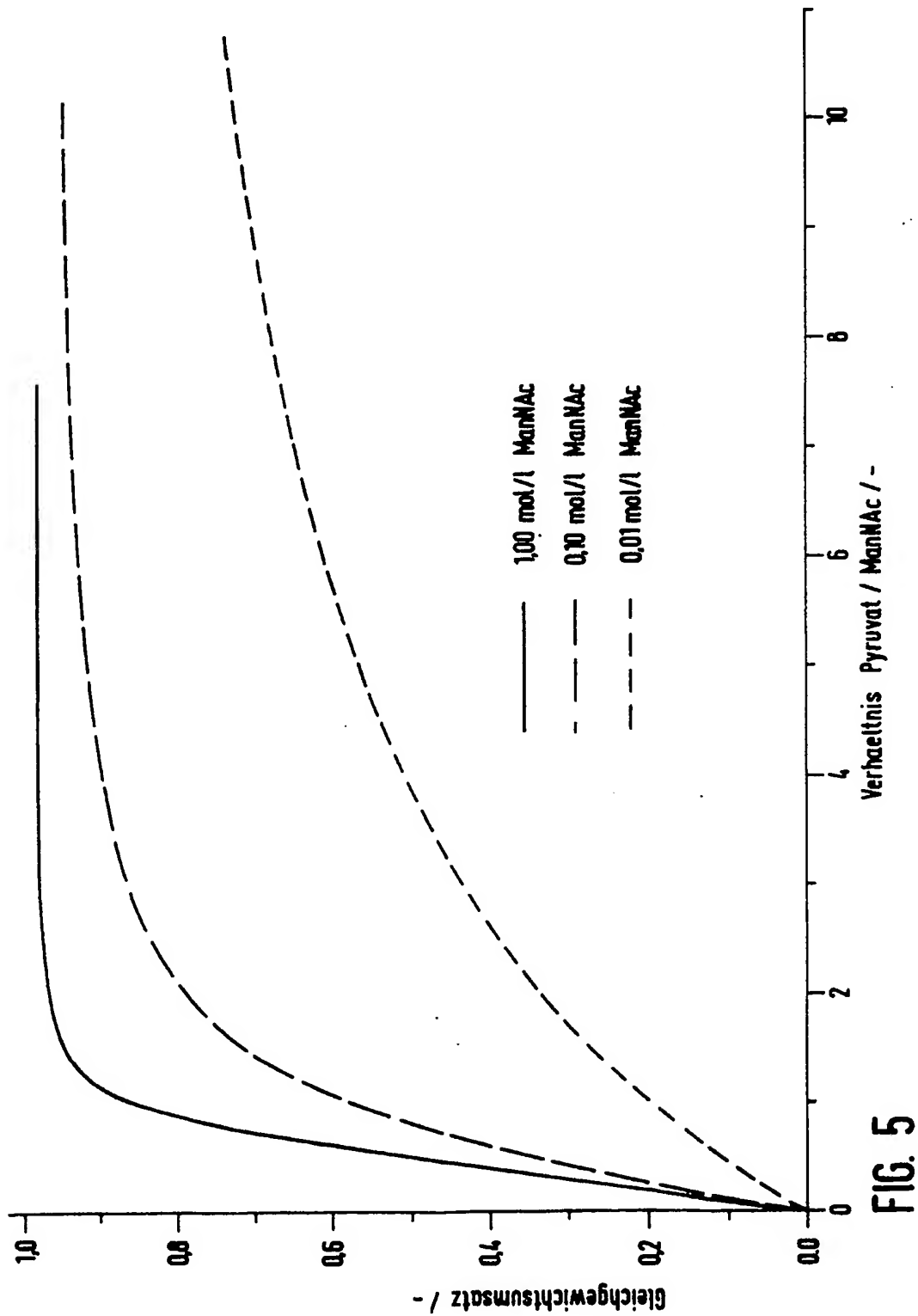


FIG. 5

EP 0 428 947 A1

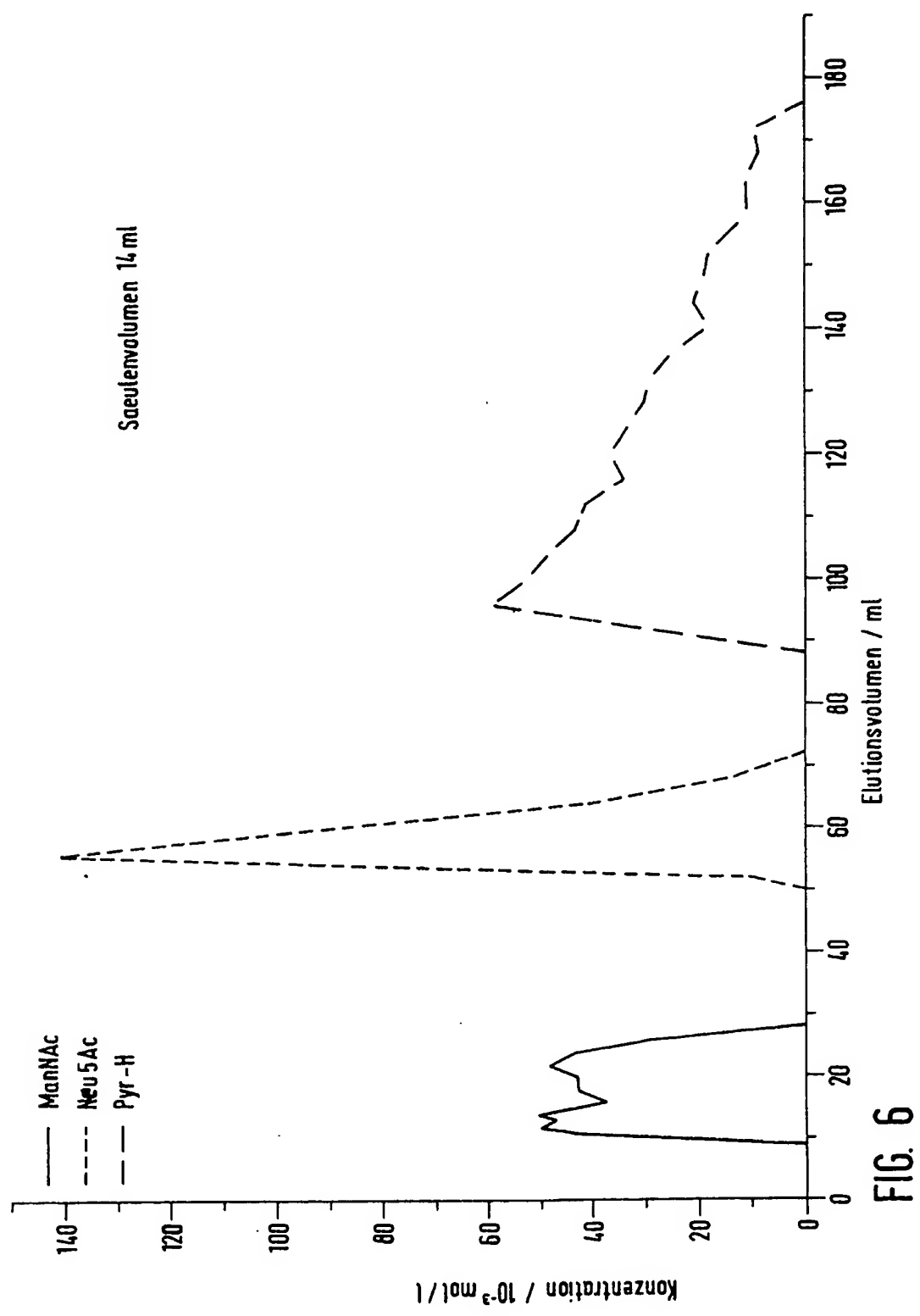


FIG. 6



European Patent
Office

EUROPEAN SEARCH REPORT

Application Number

EP 90 12 1478

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int. Cl.5)
A	TETRAHEDRON, (INCL. TETRAHEDRON REPORTS) vol. 25, no. 41, 1984, OXFORD GB pages 4663 - 4664; AUGÉ, C. et al.: "Synthesis with immobilized enzyme of the most important sialic acid" * the whole document *	1	C12P19/26
A,D	JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. vol. 110, 1988, GASTON, PA US pages 6481 - 6486; KIM, M.J. et al.: "Enzymes in carbohydrate synthesis: N-acetylneuraminic acid aldolase catalyzed reactions and preparation of N-acetyl-2-deoxy-D neuraminic acid derivatives" * page 6483, column 1, lines 42 - 45 *	1	
A	J. AM. CHEM. SOC. vol. 110, no. 21, 1988, pages 7159 - 7163; SIMON, E.S. et al.: "Synthesis of CMP-NeuAc from N-acetylglucosamine : generation of CTP from CMP using adenylate kinase" * the whole document *	1	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int. Cl.5)
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 68, 1968 Columbus, Ohio, USA KENT, P.W. et al.: "Biosynthesis of intestinal mucins; Sialic acids of sheep colonic epithelial mucin" page 5596; column 2; ref. no. 57965B * abstract *	1	C12P
A	CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 105, 1986 Columbus, Ohio, USA HAGEMEIÉ, C. et al.: "Studies on the biosynthesis of N-acetylneuraminic acid in cultured arterial wall cells" page 427; column 2; ref. no. 13147N * abstract *	1	
The present search report has been drawn up for all claims			
Place of search THE HAGUE		Date of completion of the search 14 FEBRUARY 1991	Examiner CHAMBONNET F.J.
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone V : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application I : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

EPO FORM 1503 (03/92) (P0401)